

# L'électrochimie comme outil d'exploration du vivant

Stéphane Marinesco et Stéphane Arbault

## Résumé

Les cellules vivantes libèrent constamment des espèces chimiques pour communiquer et assurer des fonctions vitales. L'électrochimie permet d'explorer les mécanismes qui sous-tendent la libération de ces molécules par l'analyse de leurs flux grâce à des microélectrodes implantées au sein des tissus ou placées au contact de cellules isolées. Ces techniques permettent aujourd'hui de suivre en continu la glycémie des patients diabétiques ou d'explorer des fonctions cérébrales complexes en corrélant la libération de neurotransmetteurs avec des comportements animaux. À une échelle encore plus réduite, l'électrochimie permet aussi de disséquer les mécanismes de libération de neurotransmetteurs ou d'espèces réactives diffusibles par des cellules en culture et peut aller jusqu'à l'étude d'organelles isolées comme les mitochondries.

## Mots-clés

Microélectrode, neurotransmetteurs, glucose, peroxyde d'hydrogène, cerveau, cellule.

## Abstract

**Electrochemistry as a tool to explore living cells and tissues**

Living cells continuously release chemical species to communicate and perform vital functions. Electrochemical techniques can explore the mechanisms that mediate the release of such molecules through their detection by microelectrodes implanted within tissues or in contact with isolated cells in culture. Such techniques now allow the continuous monitoring of glycemia in diabetic patients or the exploration of complex cerebral functions by correlating neurotransmitter release with animal behavior. At an even smaller scale, electrochemistry can decipher the mechanisms that mediate the release of neurotransmitters or reactive species, and can reach a subcellular scale by studying isolated organelles such as mitochondria.

## Keywords

Microelectrode, neurotransmitters, glucose, hydrogen peroxide, brain, cell.

Les cellules et les tissus vivants contiennent et sécrètent de nombreuses molécules oxydables – acide ascorbique, acide urique – et certains neurotransmetteurs comme la dopamine ou la sérotonine. L'électrochimie permet d'identifier sélectivement ces molécules sur la base de la thermodynamique et des cinétiques d'oxydoréduction. Certaines molécules non oxydables, comme le glucose, le lactate ou le glutamate, peuvent aussi être détectées, à condition d'avoir recours à un biocapteur. Enfin, les progrès récents en microtechnologies permettent d'obtenir des dispositifs implantables très peu invasifs assurant la continuité entre la détection au contact des cellules vivantes et les systèmes d'enregistrement. L'électrochimie est ainsi devenue une méthode de choix pour explorer les processus biologiques au sein des tissus vivants, au contact de cellules, ou bien d'organelles isolées.

## Monitorer la glycémie chez l'homme par des biocapteurs implantables

Le glucose est la première source d'énergie utilisée par les cellules vivantes. Chez l'homme, la glycémie est régulée par l'insuline, une hormone perturbée chez les patients diabétiques. Cette pathologie demande un contrôle régulier de la glycémie pour s'assurer que le glucose sanguin ne dépasse pas des seuils toxiques. Le glucose, difficilement oxydable directement sur une électrode métallique, peut être détecté par des biocapteurs. La première enzyme à avoir été utilisée est la glucose oxydase, qui dégrade le glucose en gluconolactone en produisant du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  est lui facilement oxydable en  $O_2$  ( $E^0 = 0,69$  V vs. NHE) et son analyse par ampérométrie permet d'en déduire la concentration en glucose dans le milieu. Ce type de dispositif est employé depuis de nombreuses années dans les lecteurs de glycémie portatifs [1]. Aujourd'hui, des biocapteurs implantables peuvent être placés sous la peau des diabétiques et permettent une lecture en continu de la glycémie, leur évitant ainsi les piqûres répétées [2].

## Explorer le cerveau par l'électrochimie

L'un des enjeux majeurs en neurosciences est de comprendre les processus chimiques qui permettent le codage de la perception, de l'action, de la prise de décisions, bref de tous les mécanismes qui sous-tendent la pensée. Dans ce domaine, l'électrochimie a un intérêt majeur en permettant d'analyser en temps réel les molécules libérées

par les cellules du cerveau. Par exemple, la dopamine est un important neurotransmetteur impliqué dans le codage des émotions et de la motivation, et son dysfonctionnement est à l'origine de la maladie de Parkinson. Cette molécule est directement oxydable à la surface d'une électrode de carbone ou de platine. Sa concentration extracellulaire dans le cerveau peut être suivie en temps réel par des ultra-microélectrodes (UME) (5-10  $\mu$ m de diamètre), biocompatibles (carbone), et pouvant rester implantées dans le cerveau d'animaux pendant plusieurs semaines. Les concentrations de dopamine sont déterminées par voltammétrie cyclique rapide (« fast-scan cyclic voltammetry », FSCV). Les courants d'oxydation de la dopamine en orthoquinone et de réduction de l'orthoquinone en dopamine peuvent être mesurés toutes les 100 ms et donner une signature spécifique de la dopamine. Cette approche a été implémentée chez le rat au niveau du noyau accumbens, une structure cérébrale impliquée dans les processus de motivation et de récompense [3]. L'électrochimie a permis de comprendre que la dopamine est libérée à ce niveau en réponse à un stimulus annonçant une récompense, et que sa libération est augmentée par certains stupéfiants comme la cocaïne. Ces résultats ont grandement avancé notre compréhension des mécanismes de codage des signaux de récompense par le cerveau et de leurs perturbations dans l'addiction.

D'autres molécules neuroactives difficilement oxydables peuvent aussi être détectées dans le cerveau par des biocapteurs analogues à ceux utilisés dans le diabète. Des microélectrodes enzymatiques peuvent être implantées dans le cerveau avec un minimum de dommages cellulaires pour suivre les niveaux de glucose ou de lactate, mais aussi de neurotransmetteurs comme le glutamate, la D-sérine ou l'acétylcholine. Des microbiocapteurs ont ainsi été implantés dans le cortex de rats pour suivre les concentrations extracellulaires d'acétylcholine et de choline en temps réel ; ils ont montré que les périodes au cours desquelles l'animal portait son attention sur un stimulus lumineux s'accompagnaient d'une libération d'acétylcholine [4]. À travers ces exemples, l'électrochimie devient aujourd'hui une technique de référence pour l'étude du cerveau.

## Étudier la libération d'espèces chimiques par une cellule vivante

Un certain nombre d'études sur les tissus biologiques mentionnées ci-dessus ont connu une évolution d'échelle à partir des années 1980. En effet, c'est à cette période que des électrodes de dimension

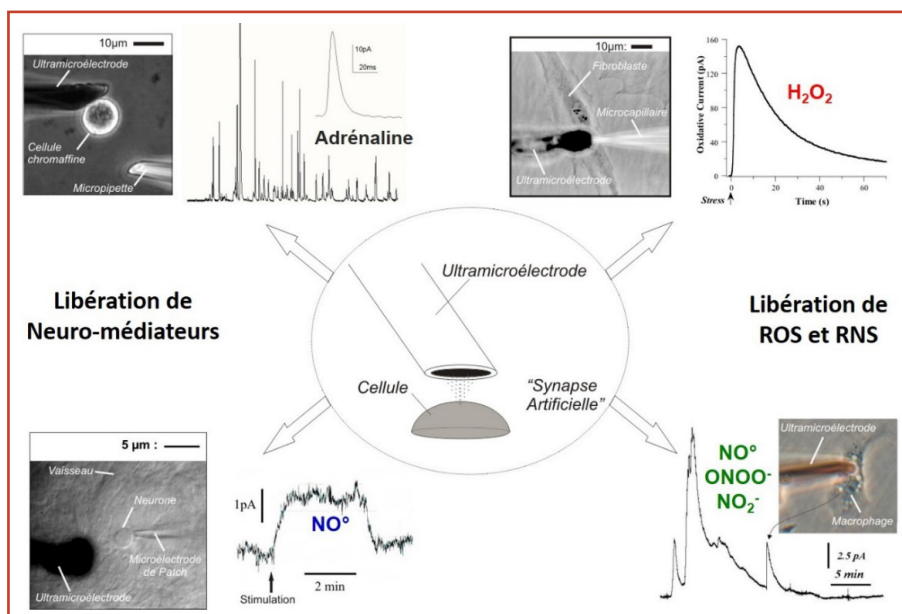


Schéma décrivant les principales applications biologiques de l'analyse électrochimique à l'échelle de la cellule vivante (principe de la synapse « artificielle »).  
 ROS : « reactive oxygen species » ; RNS : « reactive nitrogen species ».

micrométrique ont commencé à être fabriquées à partir de microfilaments de platine ou de microfibrilles de carbone, pour atteindre l'échelle d'une cellule vivante [5]. En positionnant une UME dans l'environnement immédiat d'une cellule, par micromanipulation sous microscope, on crée un confinement des espèces libérées par la cellule dans un volume compris entre la surface-membrane cellulaire et la surface de l'UME. Cette configuration a été qualifiée de « synapse artificielle » [5] puisqu'elle mime la situation réelle d'une synapse chimique entre deux neurones, dont la distance inter-membranaire est de l'ordre de 20 nm. Du point de vue analytique, la configuration de synapse artificielle conduit à une détection très efficace des molécules électroactives sécrétées par une cellule, en termes de :

- sensibilité : des flux aussi faibles que  $1\ 000\ \text{molécules}\cdot\text{ms}^{-1}$  sont détectés ; des mesures quantitatives sont réalisées ;
- temps de réponse : la cinétique des phénomènes biologiques peut être observée sans distorsion, pourvu que le temps de réponse de l'UME ne soit pas limitant ;
- sélectivité : celle-ci est offerte par le choix du potentiel d'oxydation appliqué ;
- résolution spatiale : l'UME est sensible aux variations de concentration ayant lieu dans un volume équivalent à son diamètre.

Les UME ont ainsi permis de quantifier des événements individuels de sécrétion de neurotransmetteurs par exocytose. Ce mécanisme met en jeu des vésicules-cargo intracellulaires, stockant les neurotransmetteurs et autres biomolécules, et fusionnant avec la membrane de la cellule pour libérer leur contenu vers le milieu extérieur (voir [6]). Grâce à la chrono-ampérométrie et la FSCV, les différentes phases cinétiques du processus d'exocytose ont été caractérisées : formation d'un pore de fusion initiant la libération, fusion des membranes conduisant à la libération du neurotransmetteur, puis diffusion dans le milieu jusqu'à épuisement. Les catécholamines (dopamine, adrénaline, noradrénaline), leurs précurseurs, la sérotonine, l'histamine, etc. libérés par exocytose ont pu ainsi être détectés sur différents types de cellules (neurones, cellules chromaffines, mastocytes...).

La seconde famille d'applications des analyses sur cellule unique a été fondée sur la détection des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (« reactive oxygen species », ROS ; « reactive nitrogen species », RNS) impliquées dans des mécanismes de signalisation redox et de stress oxydant. L'électrochimie offre l'avantage d'une détection directe par oxydation, voire par réduction, de plusieurs espèces majeures de cette famille issue du métabolisme de l'oxygène :  $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , le monoxyde d'azote  $\text{NO}^\circ$ , le peroxydinitrite  $\text{ONOO}^-$ , l'anion nitroxyde  $\text{NO}^-$  et les nitrites  $\text{NO}_2^-$ . Le métabolisme redox des cellules aérobies est une balance dont l'équilibre est très



finement contrôlé. La production des ROS et RNS est nécessaire pour le bon fonctionnement et la prolifération des cellules, mais leur surproduction conduit à des « dégâts » oxydatifs et à la mort cellulaire ; cette situation est qualifiée de stress oxydant. La détection de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou  $\text{NO}^\circ$  sur des cellules individuelles neuronales, de la peau, de l'endothélium, immunitaires, etc. a apporté la preuve de cette sécrétion d'espèces réactives [7]. En particulier, l'analyse à l'échelle de la cellule a permis de démontrer une production de peroxydinitrite  $\text{ONOO}^-$  (durée de vie  $\approx 1\ \text{sec.}$ ) par des cellules en situation de stress.

Ces études connaissent depuis une décennie une nouvelle évolution grâce à des gains de sensibilité et à la diminution de la taille des électrodes, en tendant vers l'échelle submicrométrique, voire nanométrique. Ces gains permettent l'analyse d'un compartiment subcellulaire (membrane, cytoplasme) ou d'un organelle. En particulier, des analyses sur des mitochondries isolées ont été effectuées pour comprendre les relations quantitatives entre consommation d'oxygène et libération de peroxyde d'hydrogène [8]. Ainsi, il a été montré que les mitochondries produisent des « bouffées » nanomolaires de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , attribuées à la signalisation redox qu'elles réalisent.

Ces différents exemples illustrent l'importance accordée aujourd'hui à l'électrochimie comme outil d'exploration du vivant, depuis le diagnostic des pathologies chez le patient humain jusqu'à l'étude des organelles situées à l'intérieur des cellules vivantes. Nul doute que les progrès en miniaturisation, en biocompatibilité et en traitement du signal accroîtront encore la gamme d'applications de ce domaine de la chimie pour la biologie et la médecine.

### Références

- [1] Heller A., Feldman B., Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, p. 2482.
- [2] Kotanen C.N., Moussy F.G., Carrara S., Guiseppi-Elie A., Implantable enzyme amperometric biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, **2012**, *35*, p. 14.
- [3] Robinson D.L., Hermans A., Seipel A.T., Wightman R.M., Monitoring rapid chemical communication in the brain, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, p. 2554.
- [4] Parikh V., Kozak R., Martinez V., Sarter M., Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple timescales, *Neuron*, **2007**, *56*, p. 141.
- [5] Amatore C., Arbault S., Guille M., Lemaitre F., Electrochemical monitoring of single cell secretion: vesicular exocytosis and oxidative stress, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, p. 2585.
- [6] Alonso-Nanclares L., Kastanauskaitė A., Rodriguez J.R., Gonzalez-Soriano J., Defelipe J., A stereological study of synapse number in the epileptic human hippocampus, *Frontiers in Neuroanatomy*, **2011**, *5*, p. 8.
- [7] Griveau S., Bedioui F., Overview of significant examples of electrochemical sensor arrays designed for detection of nitric oxide and relevant species in a biological environment, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, *405*, p. 3475.
- [8] Suraniti E., Ben-Amor S., Landry P., Rigoulet M., Fontaine E., Bottari S., Devin A., Sojic N., Mano N., Arbault S., Electrochemical monitoring of the early events of hydrogen peroxide production by mitochondria, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2014**, *53*, p. 6655.

 <p><b>S. Marinesco</b></p>	<p><b>Stéphane Marinesco</b>  est chargé de recherche au Centre de recherches en Neurosciences de Lyon, Inserm*.  <b>Stéphane Arbault</b>  est directeur de recherche CNRS à l'Institut des Sciences moléculaires, ENSCBP, Bordeaux**.</p>	 <p><b>S. Arbault</b></p>
--	--	--

\* Centre de recherches en Neurosciences de Lyon, Équipe Waking, Inserm U1028/ CNRS UMR 5292, Université Claude Bernard Lyon 1, 8 avenue Rockefeller, F-69373 Lyon Cedex 08.  
 Courriel : stephane.marinesco@univ-lyon1.fr  
 \*\* Université de Bordeaux, Institut des Sciences moléculaires, CNRS UMR 5255, Groupe Nanosystèmes analytiques, ENSCBP, 16 avenue Pey Berland, F-33607 Pessac.  
 Courriel : stephane.arbault@u-bordeaux.fr